



СОЮЗ СОВЕТСКИХ
СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ
РЕСПУБЛИК

(19) **SU** (11) **1822876 A1**

(51) **С 12 N 5/00**

ГОСУДАРСТВЕННОЕ ПАТЕНТНОЕ
ВЕДОМСТВО СССР
(ГОСПАТЕНТ СССР)

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ

ВНЕШНЯЯ
ПАТЕНТНО-ТЕХНИЧЕСКАЯ
БИБЛИОТЕКА

BEST AVAILABLE COPY

1

(21) 4918466/13

(22) 29.11.90

(46) 23.06.93. Бюл. № 23

(71) Всесоюзный научно-исследовательский институт гриппа, Ленинградский институт киноинженеров, Военно-медицинская академия им. С.М.Кирова и Туркменский государственный медицинский институт

(72) К.С.Каранов, Н.Н.Нурмамедов, П.М.Завлин, М.М.Дронов и Л.Ф.Литвинчук

(56) 1. Завлин П.М. и Дьяконов А.Н. Органические соединения в производстве и обработке светочувствительных материалов. Дубители. Учебное пособие. - Л., 1984.

2. Lumblatt M.M. et al., Ophthalmology, 1980, v. 29, p. 498-506.

(54) СПОСОБ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ПОДЛОЖКИ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК ЗАДНЕГО ЭПИТЕЛИЯ РОГОВИЦЫ ГЛАЗА

2

(57) Использование: биотехнология, медицина. В 3%-ный водный раствор желатины вводят N,N,N',N'-тетраизопропоксиметилдиамид малоновой кислоты (в виде 1%-ного водного раствора) до конечной концентрации $0,9 \times 10^{-4}$ М. Приготовление пленок-подложек в отверстии миллипорового фильтра осуществляют путем погружения его в 3%-ный водный раствор желатины, затем сушат при температуре 20°C и относительной влажности 65% в течение 30 мин. Способ позволяет упростить и ускорить процесс приготовления желатиновых подложек для культивирования клеток заднего эпителия роговицы глаза и их последующей трансплантации. 1 табл.

Изобретение относится к медицине и преимущественно может быть использовано в офтальмологии, в частности для получения сплошного монослоя клеток заднего эпителия *in vitro* на подложке для его последней трансплантации *in vivo* при различной патологии роговой оболочки глаза.

Целью изобретения является упрощение и ускорение процесса приготовления подложки путем замены используемого в прототипе глутарового альдегида соединением N,N,N',N'-тетраизопропоксиметилдиамида малоновой кислоты.

Для достижения поставленной цели в 3%-ный водный раствор желатины (ПО "Свема", Шостка) вводится $0,5-0,9 \times 10^{-4}$ М N,N,N',N'-тетраизопропоксиметилдиамида

малоновой кислоты (в виде 1%-ного водного раствора) на 1 г воздушно-сухого желатина.

Пример 1. Готовится 3%-ный водный раствор желатины, в который вводится $0,5 \times 10^{-4}$ М N,N,N',N'-тетраизопропоксиметилдиамида малоновой кислоты. Из этого раствора, поддерживаемого при 30°C пленки-подложки готовятся так же, как и в прототипе, т.е. в отверстии миллипорового фильтра. Желатиновые подложки сушатся при температуре 20°C и относительной влажности 65% в течение 35-40 мин. После промывания в 2 сменах физиологического раствора и в растворе питательной среды по 15 мин пленки укладываются на дно лунок пластикового планшета, куда вводится суспензия клеток заднего эпителия роговицы

(19) **SU** (11) **1822876 A1**

глаза кролика плотностью 500 кл/мл. Инкубация в термостате при температуре 37°C в атмосфере увлажненного воздуха в 5% CO₂. Используемая среда: ДМЕМ (Dulbecco's modified Eagle medium) с 15% фетальной сыворотки крупного рогатого скота и смесью антибиотиков. Через 48 ч культивирования 1/3 площади подложки была заполнена активно растущими клетками, форма и размер которых характеризовались выраженным полиморфизмом. Однако было отмечено, что вся поверхность подложки пронизана множеством складок, что по нашему мнению, является результатом недостаточной концентрации структурирующего агента (дубителя). На 5-6 сутки культивирования клетками было покрыто 2/3 площади подложки, а на 10-11 сутки культура достигла конфлюентного состояния. Клетки приобрели форму неправильных шестиугольников, но плотного прилегания клеток друг к другу не наблюдалось из-за складчатости подложки.

Таким образом, общее время приготовления подложки составляет 80-85 мин.

Пример 2. Готовится 3%-ный водный раствор желатины, в который вводится 0.7×10^{-4} М N,N,N',N'-тетраизопропоксиметилдиамида малоновой кислоты. Пленки готовятся аналогично примеру 1, но в отличие от него высыхают на 5-10 мин скорее, т.е. в течение 30-35 мин. После промывания в 2 сменах физиологического раствора и в растворе питательной среды по 15 мин пленки использовались в качестве подложки для культивирования клеток заднего эпителия роговицы глаза кролика. Через 48 ч культивирования 1/3 площади подложки была заполнена распластанными и активно растущими клетками, форма и размер которых также характеризовались выраженным полиморфизмом; подложка выглядела гладкой и равномерно растянутой на всем протяжении. На 5-6 сутки культивирования клетками было покрыто 2/3 площади подложки. Большинство клеток сохраняло оторосчатую форму, но их полиморфизм был менее выражен. На 7-8 сутки культивирования культура достигла конфлюентного состояния: клетки приобретали шестигранную форму и плотно прилегали друг к другу.

Общее время приготовления подложки составляет 75-80 мин.

Пример 3. Готовится 3%-ный водный раствор желатины, в который вводится 0.9×10^{-4} М N,N,N',N'-тетраизопропоксиметилдиамида малоновой кислоты. Пленки готовятся аналогично примеру 2, но высыхают они на 5-10 мин скорее, т.е. в течение 25-30 мин. После промывания в 2 сменах физио-

логического раствора и в растворе питательной среды по 15 мин пленки использовались в качестве подложки для культивирования клеток заднего эпителия роговицы глаза кролика. Состояние подложки, а также динамика роста клеток и скорость образования монослоя аналогичны примеру 2, однако морфология клеток резко отличалась. Культура характеризовалась резко выраженным полиморфизмом и по достижению конфлюентного состояния, а в некоторых клетках выявлялись цитоплазматические вакуоли, что свидетельствовало о некоторой токсичности подложки.

Общее время приготовления подложки составляет 70-75 мин.

Таким образом, существенным отличием предлагаемого изобретения является замена используемого в прототипе глутарового альдегида на формальдегидный дубитель N,N,N',N'-тетраизопропоксиметилдиамид малоновой кислоты, обладающий меньшей восстановительной активностью, чем глутаральдегид. Подобное решение задачи является оригинальным и не вытекает из известного уровня знаний, поскольку N,N,N',N'-тетраизопропоксиметилдиамид малоновой кислоты использован в совершенно отличной от медицинской сфере, а именно в качестве дубителя в производстве фотопленок в концентрации 1×10^{-3} М на 1г воздушно-сухого желатина.

Использование заявляемого способа позволяет упростить и ускорить процесс приготовления желатиновой подложки для культивирования клеток заднего эпителия роговицы для их последующей трансплантации *in vivo* более чем в 10 раз (см. таблицу). Выбранная концентрация дубителя от 0.5 до 0.9×10^{-4} М является оптимальной, что подтверждается результатами экспериментов, представленных в таблице.

Формула изобретения

Способ приготовления подложки для культивирования клеток заднего эпителия роговицы глаза, включающий погружение имеющего отверстие миллипорового фильтра в 3%-ный водный раствор желатины при температуре 30°C, введение сшивающего агента с последующим высушиванием при 20°C и относительной влажности 65%, отличающийся тем, что, с целью упрощения и ускорения приготовления подложки, в качестве сшивающего агента используют $0.5-0.9 \times 10^{-4}$ М N,N,N',N'-тетраизопропоксиметилдиамида малоновой кислоты, который вводят в виде 1% ного водного раствора.

Характеристика предлагаемого и прототипного способов.

Параметры	Прототип	Предлагаемый способ				
		Желатина + $0,4 \cdot 10^{-4}$ М дубител- ля	Желатина + $0,5 \cdot 10^{-4}$ М дубител- ля	Желатина + $0,7 \cdot 10^{-4}$ М дубител- ля	Желатина + $0,9 \cdot 10^{-4}$ М дубител- ля	Желатина + $1,0 \cdot 10^{-4}$ М дубител- ля
Общее время при- готовления под- ложки	885 мин	85-80 мин	80-85 мин	75-80 мин	70-75 мин	65-70 мин
Морфология кле- ток	Нормальный моно- слой образуется на 5 сутки	Клетки оседают, распластываются, но монослой не формируется из-за дряблости подлож- ки	Отсутствует плот- ное прилегание клеток друг к дру- гу, монослой обра- зуется на 10-11 сутки	Нормальный моно- слой образуется на 7-8 сутки	Резко выражен- ный полиморфизм клеток, наличие цитоплазматиче- ской вакуолей. Мо- нослой формиру- ется на 7-8 сутки	30% клеток от по- севной concentra- ции оседают, распластываются, но на 3-4 сутки де- генерируются, а на 5 открепляются от подложки

BEST AVAILABLE COPY

Редактор Составитель К. Каранов
Техред М.Моргентал Корректор О.Юрковацкая

Заказ 2173 Тираж Подписное
ВНИИПИ Государственного комитета по изобретениям и открытиям при ГКНТ СССР
113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., 4/5